

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591871  
 研究課題名 (和文) NF- $\kappa$ B 活性阻害剤の尿路上皮癌への抗癌剤としての応用  
 研究課題名 (英文) Application of a novel NF- $\kappa$ B inhibitor as anticancer drug for urothelial cancer.  
 研究代表者  
 堀口 裕 (HORIGUCHI YUTAKA)  
 東京医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：60229234

研究成果の概要： 本研究において、これまでほとんど研究がなされていなかった進行性尿路上皮癌における転写因子NF- $\kappa$ Bの役割と、新規NF- $\kappa$ B活性阻害剤DHMEQの作用、その阻害機構が解明された。これをもとに抗癌剤CPT-11によるNF- $\kappa$ B活性化をDHMEQにより抑制することにより、膀胱癌に対する抗腫瘍効果の増強が示された。DHMEQとCPT-11の併用は新規膀胱癌治療として期待できると考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：尿路上皮癌、分子標的治療、NF- $\kappa$ B、転写因子、アポトーシス、CPT-11

## 1. 研究開始当初の背景

(1)すでに微生物由来で抗菌物質のエポキシキノマイシンの骨格を改良してNF- $\kappa$ B活性の阻害剤DHMEQが、慶應義塾大学工学部梅澤一夫教授により見い出されていた (Ariga, A. et al. J. Biol. Chem., 277: 24625-24630, 2002)。

(2)われわれは、これまでにサイトカイン産生腫瘍に対し、NF- $\kappa$ B抑制物質であるI $\kappa$ Bの

cDNAをアデノウイルスベクターを用いて腫瘍細胞に遺伝子導入し、その際の細胞障害性、特にapoptosisの誘導の有無を検討、報告してきた。

(3)DHMEQの動物レベルでの活性は、マウスリユーマチモデルを阻害することが報告されていたが、腫瘍モデルにおけるin vivoでの生理活性、治療効果は不明であった。

## 2. 研究の目的

(1)本研究の第一の目的は、新規NF- $\kappa$ B活性阻害剤DHMEQにより、サイトカイン産生性尿路上皮癌細胞における抗腫瘍性の有無を検証し、臨床応用への可能性を探るものである。  
(2)そこで本研究においては、ヌードマウスにおけるヒト移植癌に対するDHMEQの治療効果を調べる。また、動物に対する毒性についても検討し、DHMEQが新たな抗癌剤として臨床応用可能か検討する。

## 3. 研究の方法

(1)NF- $\kappa$ B活性阻害剤DHMEQの*in vitro*での尿路上皮癌に対する抗癌活性

NF- $\kappa$ B高活性であることが示されているサイトカイン産生ヒト膀胱癌細胞KU-19-19に対してのDHMEQによるNF- $\kappa$ B抑制効果を調べる。この際、細胞内においてのシグナル伝達がDHMEQにより、どのように変化しているのかをWestern blot法やElectrophoretic mobility shift assay (EMSA) によるNF- $\kappa$ B DNA binding activityにより解析する。以上より、DHMEQによるサイトカイン産生尿路上皮癌を標的とした腫瘍選択的抗癌治療の基礎を確立する。

(2) NF- $\kappa$ B活性阻害剤DHMEQの*in vivo*抗腫瘍効果の検討

ヌードマウスにKU-19-19を皮下移植した実験系で、DHMEQの抗腫瘍効果を検討する。皮下腫瘍モデルを作成後、各種濃度のDHMEQを、腹腔内投与し、*in vivo*での抗腫瘍効果を検討する。癌組織内で、DHMEQによりどのようなメカニズムで抗腫瘍効果がもたらされるのかを、組織内のアポトーシスの誘導や、NF- $\kappa$ B活性抑制効果、さらには新生血管抑制効果や各種サイトカインの発現レベルを調べることにより解明して行く。

(3)DHMEQによる、膀胱癌に対する新規治療薬としての位置づけを確立するため、抗癌剤CP T-11との併用による膀胱癌に対する殺細胞効果増強の検討を行う。

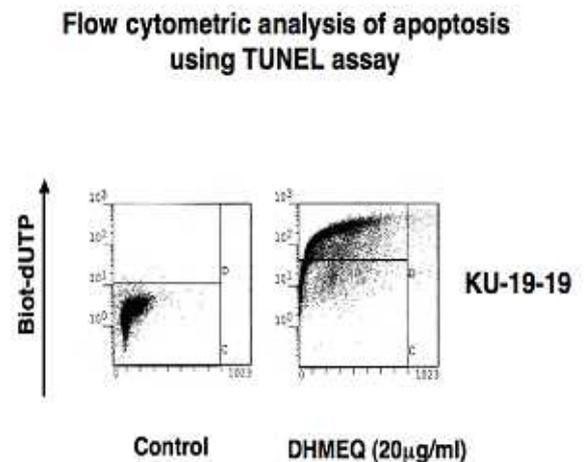
(4)膀胱癌動物実験モデルの作製

8週齢のC3Hマウス雌をペントバルビタール腹腔内投与にて麻酔下に、24ゲージカテーテルを経尿道的に膀胱内に挿入する。つぎに膀胱内に同系マウスに化学発癌物質を経口投与することにより誘導・樹立されたMBT-2マウス膀胱癌細胞株を移植し、同種正所性マウス膀胱癌モデルを作成する。これまで広く用いられてきた皮下腫瘍(異所性)モデルと異なり、この膀胱粘膜上皮から腫瘍が発生する、ヒト表在性膀胱癌を模擬した動物実験モデルは、より病理学的に実際の臨床に近く、膀胱内治療を検討する上で最適なモデルと考える。同時に、ヌードマウス雌の膀胱内にKU-19-19ヒト膀胱癌樹立細胞株を移植し、正所性ヒト膀胱癌モデルの作成も試みる。

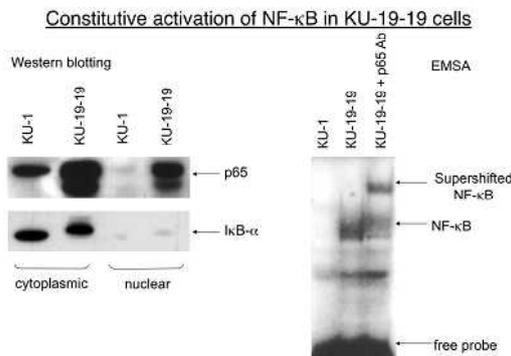
## 4. 研究成果

(1)NF- $\kappa$ B活性阻害剤DHMEQの尿路上皮癌に対する抗癌活性

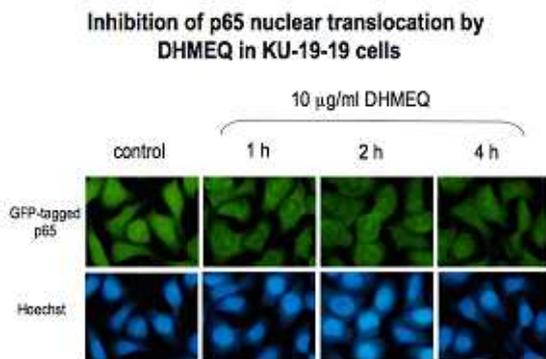
DHMEQは20 $\mu$ g/mlでKU-19-19細胞の増殖を抑制し、細胞死を誘導した。



electrophoresis mobility shift assay を用いて検討したところ、DHMEQ 10  $\mu$ g/ml 処理後 2-6 時間で NF- $\kappa$ B 活性が阻害された。



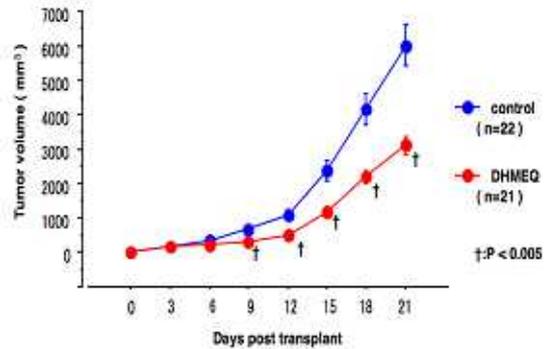
GFP 標識 p65 を用いた観察により、DHMEQ は NF- $\kappa$ B の核移行を阻害していることが示された。DHMEQ は I $\kappa$ B のリン酸化、分解には影響しなかった。



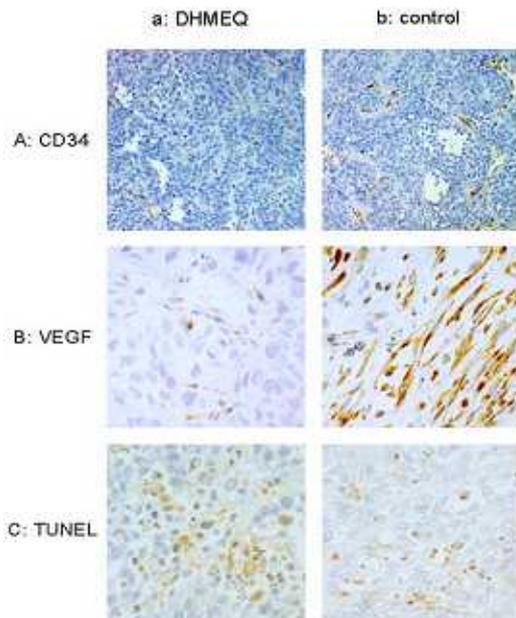
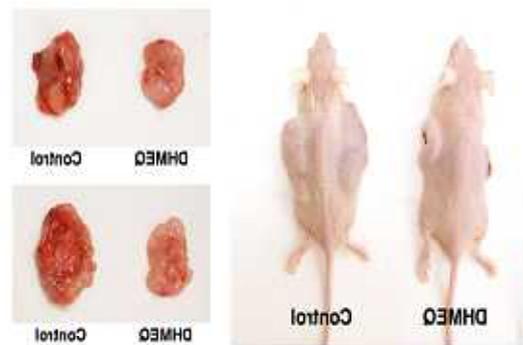
さらに、xenograft model において抗腫瘍効果が示された。

DHMEQ 治療を受けた腫瘍組織内においては、コントロールと比較して、アポトーシスが誘導され、さらに新生血管抑制効果が認められた。

Inhibition of KU-19-19 tumor growth by DHMEQ (1)



(S) DHMEQ による KU-19-19 腫瘍増殖の抑制



以上より、DHMEQ は、KU-19-19 膀胱癌細胞において恒常的に活性化された NF- $\kappa$ B を阻害する作用を持ち、分子標的治療薬となりうる

ことが示された。

(2)DHMEQ と抗癌剤 CPT-11 との併用による膀胱癌に対する殺細胞効果増強の検討

KU-19-19 細胞で、5  $\mu$ g/mL 以上の DHMEQ 単独、0.15ng/mL 以上の SN38(CPT-11 の代謝活性物) 単独投与により濃度依存性に増殖抑制効果が認められた。無治療群と比較し、5  $\mu$ g/mL DHMEQ 単独投与で 18%、0.3ng/mL SN38 単独投与で 26%、両治療併用群で 55%の細胞障害増強が示された。NF- $\kappa$ B は SN38 単独投与で活性化されたが、DHMEQ はこれを抑制した。さらに KU-19-19 マウス皮下腫瘍モデルを用いて抗腫瘍効果を検討した。実験開始 25 日目における DHMEQ+CPT-11 併用群の腫瘍体積 ( $374 \pm 73\text{cm}^3$ ) は DHMEQ 単独群 ( $1962 \pm 202\text{cm}^3$ )、CPT-11 単独群 ( $821 \pm 82\text{cm}^3$ )、無治療群 ( $2675 \pm 238\text{cm}^3$ ) と比較し有意に減少していた。併用治療群の組織内において有意な CD31、MMP-9 の減少、アポトーシスの増加が認められた。

以上より、DHMEQ は CPT-11 の NF- $\kappa$ B 活性化を効率に抑制し、膀胱癌に対し抗腫瘍効果の増強を示した。DHMEQ と CPT-11 の併用は新規膀胱癌治療として期待できると考えられた。

(3)膀胱癌動物実験モデルの作製

$5 \times 10^5$  の MBT-2 マウス膀胱癌細胞を同種 C3H/HeJ マウスの膀胱内に経尿道的に注入し、腫瘍を生着させる方法を用いた。実験を試みた 100%のマウスにおいて膀胱内腫瘍が認められた。腫瘍移植後 18.0 $\pm$ 0.7 日で、腹壁から触知できる膀胱内腫瘍が認められた。24.4 $\pm$ 1.7 日で、肉眼的血尿が出現し、平均生存日数は 38.9 $\pm$ 2.0 日であった。死因は、膀胱腫瘍の局所浸潤による尿路閉塞が主であった。骨盤内リンパ節転移を伴う場合が認めら

れたが、血行性の他臓器転移は認めなかった。腫瘍生着を促進する目的で、腫瘍細胞を注入する前に、膀胱粘膜を電気凝固する処置は、腫瘍の浸潤傾向を強くした。実験開始時のマウスは最低でも 8 週齢とすべき点と、in vitro における MBT-2 細胞培養において、Mycoplasma 感染がないことを確認することが重要である。また、予備実験にて、C3H マウス substrain の選択にも注意を要すると思われた。本モデルは、動物実験手技としては比較的容易であり、別個の施設・研究者において再現性があることが確認できた。

以上より、C3H マウスの膀胱内に MBT-2 細胞を注入する手技により、高率に表在性膀胱腫瘍モデルを作製しうることを示した。本モデルは容易に作製でき、さまざまな新規膀胱内治療薬の基礎研究に有用であると思われる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

Ozu, C., Takeuchi, H., Matsushita, K., Horiguchi, Y., et al. (合計 8 名中 4 番目) Establishment and characterization of a new squamous cell carcinoma cell line, TMUU-08, derived from human bladder cancer, Human Cell、査読有、22、2009、25-29

Horiguchi, Y., Kikuchi, E., Ozu, C., Nishiyama, T., Oyama, M., Horinaga, M., Yoshioka, K., Tachibana, M. Establishment of orthotopic mouse superficial bladder tumor model for studies on intravesical treatments, Human Cell、査読有、21、2008、57-63

[学会発表](計 2件)

菊地栄治、堀口 裕ほか、膀胱癌における新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤を用いた CPT-11 の抗癌治療の増強、第 12 回がん分子標的治療研究会総会、平成 20 年 6 月 26 日、学術総合センター(東京)

堀口 裕、泌尿器科領域における医療改善製剤の創製、慶大理工学部ハイテクリサーチセンターシンポジウム、平成19年12月8日、慶大理工学部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀口 裕 (HORIGUCHI YUTAKA)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号 60229234

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし